

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: THERESE TERNYNCK ET AL  
SERIAL NO: 09/497,997  
FILED: FEBRUARY 4, 2000  
FOR: VECTORS DERIVED FROM ANTIBODIES FOR TRANSFERRING SUBSTANCES INTO CELLS

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
FRANCE	9709972	AUGUST 4, 1997

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- are submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- (B) Application Serial No.(s)
  - are submitted herewith
  - will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



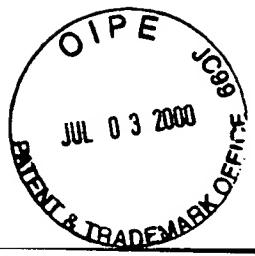
Norman F. Oblon  
Registration No. 24,618

Daniel J. Pereira, Ph.D.  
Registration No. 45,518



22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 10/98)



#5

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le ..... 24 MARS 2000 .....

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télecopie 

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

84 APR 1997  
97 09972 -

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

4.8.97

## 2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

- brevet d'invention  demande divisionnaire  
 certificat d'utilité  transformation d'une demande de brevet européen



n°du pouvoir permanent, références du correspondant  
B3671 - PB      date 01 44 51 18 00

Établissement du rapport de recherche

 différé  immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

oui  non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**VECTEURS DERIVES D'ANTICORPS POUR LE TRANSFERT DE  
SUBSTANCES DANS LES CELLULES**

## 3 DEMANDEUR (S) n° SIREN :

code APE-NAF :

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

INSTITUT PASTEUR

Forme juridique

Fondation privée reconnue  
d'utilité publique

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète(s)

Pays

25-28 rue du Docteur Roux  
75724 PARIS CEDEX 15

FRANCE

## 4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

 oui nonEn cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre   
Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

## 5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

 requise pour la 1ère fois requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

## 6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

## 7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

## 8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A.

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

SCHWARTZ Thierry  
GEL 46 07/04



## DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

B 3671 - PB

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR  
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9709972

## TITRE DE L'INVENTION :

VECTEURS POUR LE TRANSFERT DE SUBSTANCES DANS LES CELLULES

## LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A.

3 rue Chauveau-Lagarde  
75008 PARIS

## DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

TERNYNCK Thérèse  
39 boulevard Garibaldi  
F - 75015 PARIS

AVRAMEAS Alexandre  
139 rue J. Grimau  
F - 94400 VITRY SUR SEINE

BUTTIN Gérard  
63 rue Croulebarbe  
F - 75013 PARIS

AVRAMEAS Stratis  
1 rue Sarasate  
F - 75015 PARIS

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

SCHWARTZ Thierry  
CPI n° 96-0704

**DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS**

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
28			X	12.11.92	14 NOV. 1997 - SR

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

BT 244 / 171180

5        La présente invention est relative au transfert actif d'haptènes, de protéines, de peptides, d'acides nucléiques et autres molécules dans les cellules. La présente invention concerne plus particulièrement de nouveaux polypeptides capables de pénétrer efficacement dans les cellules, notamment eucaryotes, et d'y véhiculer une substance d'intérêt. Cette invention revêt une  
10      importance majeure puisqu'elle peut être appliquée à divers domaines, notamment celui de la thérapie génique et des vaccins.

La thérapie génique demeure conditionnée par un nombre considérable de paramètres, parmi lesquels le développement de vecteurs capables de transférer dans le cytoplasme des cellules de l'organisme de l'hôte considéré  
15      des principes actifs doués de propriétés spécifiques prédéterminées, en l'absence d'altérations génétiques associées à l'utilisation de ces vecteurs, et sans dégradation de l'activité biologique des principes actifs transférés. On sait qu'à ce jour, en dépit des efforts réalisés pour le développement de vecteurs d'origine virale ou non-virale, toutes ces conditions n'ont pas été remplies de  
20      manière satisfaisante.

Par ailleurs, la possibilité de véhiculer efficacement des substances à l'intérieur des cellules est également importante pour toutes les applications des biotechnologies. Ainsi, le transfert de substances dans les cellules *in vitro* ou *ex vivo* peut être utilisé soit pour la production de protéines ou de peptides, soit  
25      pour la régulation de l'expression de gènes ou encore soit pour l'analyse des propriétés d'une substance donnée sur ladite cellule. *In vivo*, le transfert d'une substance dans une cellule peut en outre servir à la création de modèles pour l'étude de pathologies chez les animaux ou également pour étudier l'effet de composés donnés sur un organisme.

La présente invention a donc pour but de mettre à disposition un nouveau type de vecteurs à la fois efficaces et d'une plus grande innocuité que les vecteurs viraux dont l'utilisation est envisagée à ce jour.

Dans la demande de brevet n° FR N° 9508316, le demandeur a décrit  
5 l'utilisation d'anticorps ou de leurs fragments F(ab')2 et Fab' capables de pénétrer à l'intérieur des cellules vivantes, comme immunovecteurs pour le transfert intracytoplasmique et intranucléaire de substances biologiquement actives. Bien que ces vecteurs présentent une efficacité importante, leur utilisation pourrait, dans certaines applications, présenter une complexité.  
10 Ainsi, l'emploi d'anticorps ou de fragments F(ab')2 d'anticorps implique la production de ces molécules à des titres élevés et avec des qualités compatibles avec une utilisation thérapeutique. En outre, l'utilisation de molécules de la taille et de la complexité des anticorps peut représenter un autre inconvénient sur le plan de la mise en oeuvre notamment. Le brevet n°  
15 US5,635,383 illustre un autre type de vecteur complexe, à base de polylysine, pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules.

La présente demande est relative à de nouveaux polypeptides présentant des propriétés avantageuses pour le transfert de substances dans les cellules. Ces polypeptides ont notamment une structure primaire  
20 beaucoup plus simple que des anticorps et une taille réduite. En outre, leur préparation est aisée et leurs applications potentielles très variées.

Plus particulièrement, la présente invention résulte de la découverte, par les inventeurs, qu'il est possible d'identifier à partir d'anticorps entiers, des régions limitées porteuses d'une activité de pénétration cellulaire. L'invention  
25 découle en outre de la découverte qu'il est possible d'isoler à partir d'anticorps entiers en particulier à partir d'une seule chaîne de ces anticorps, des peptides ou polypeptides doués d'activité de pénétration cellulaire. La présente invention constitue la première démonstration qu'un fragment d'une seule chaîne d'un anticorps peut effectivement pénétrer dans les cellules. La  
30 présente invention constitue également la première démonstration qu'un tel

fragment est en plus capable, de manière avantageuse, de véhiculer dans ladite cellule une substance d'intérêt.

La présente invention fournit donc de nouvelles molécules particulièrement adaptées au transfert dans les cellules eucaryotes, 5 particulièrement des cellules de mammifères, de substances biologiquement actives.

Un premier objet de l'invention réside donc plus particulièrement dans un polypeptide caractérisé en ce que :

- il est constitué d'un motif peptidique unique ou répété,
- 10 - il comprend une séquence d'amino-acide constituée d'un ou plusieurs fragment(s) différent(s) d'anticorps, et,
- il est capable de pénétrer dans les cellules.

Les polypeptides selon l'invention comprennent donc un ou plusieurs fragment(s) d'un anticorps. Les anticorps, molécules de la superfamille des 15 immunoglobulines, sont constitués sous leur forme la plus simple de quatre chaînes associées entre-elles (IgG par exemple) : deux chaînes lourdes, dites "Heavy" ou "H", et deux chaînes légères, désignées "Light" ou "L" (Figure 1). Ces quatre chaînes sont donc associées ensemble, post-synthèse, pour former une molécule d'un poids moléculaire de 150.000 Kd environ. La 20 spécificité antigénique des anticorps est assurée par des domaines variables impliquant plusieurs régions d'une chaîne lourde et plusieurs régions d'une chaîne légère (Figure 1).

Les polypeptides peuvent aussi être constitués de séquences provenant des autres représentants des immunoglobulines telles que les IgM.

25 Chaque chaîne lourde des anticorps est composée de 450 acides aminés environ, et comprend différents domaines, désignés domaine constant (C), domaine variable (V) et domaines de jonction (D et J). A l'intérieur des domaines variables se trouvent des motifs particuliers, désignés CDR ("Complementarity Determining Region) qui peuvent être aisément localisés 30 par alignement de séquences (C. Janeway et P. Travers, 1996, Immunobiology, Academic Press, "The Structure of A Typical Antibody

Molecule"). On peut aussi se référer pour l'analyse des séquences des régions variables à l'article de T.T. Wu et E. Kabat (J. Exp. Med., 1970, Vol. 132, p. 211-250).

La présente demande résulte de la mise en évidence qu'il est possible d'obtenir, à partir de la structure des anticorps, des régions limitées en taille et de structure simple, possèdant des propriétés tout à fait avantageuses. Ainsi, partant d'une molécule complexe (quatre chaînes associées) et de taille importante (150.000 Kd), le demandeur a réussi à construire des polypeptides à chaîne unique, ayant la capacité de pénétrer dans les cellules et d'y véhiculer des substances d'intérêt. Les propriétés des polypeptides de l'invention sont d'autant plus remarquables que leurs séquences correspondent à celles d'un ou plusieurs fragments d'une seule des chaînes d'un anticorps et qu'ils n'ont donc pas besoin, pour être actifs, de régions provenant d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. Les polypeptides selon l'invention obtenus par synthèse chimique ont les mêmes propriétés.

Le terme polypeptide désigne au sens de l'invention une molécule comprenant un enchaînement d'acides aminés, ayant une taille comprise entre 3 et 100 acides aminés, par exemple inférieure à 60 acides aminés. Encore plus préférentiellement, il s'agit d'un molécule comprenant un enchaînement de 3 à 60 acides aminés, avantageusement de 3 à 30. Des polypeptides particulièrement préférés comportent avantageusement plus de 10 acides aminés environ. Le polypeptide selon l'invention peut en outre comporter certaines modifications structurales, de nature chimique ou enzymatique par exemple. Ainsi, le polypeptide selon l'invention peut comporter certains groupes fonctionnels pouvant, par réaction chimique ou enzymatique, réaliser un couplage avec une autre substance. Les polypeptides de l'invention peuvent en outre être modifiés chimiquement afin de les rendre plus résistants à des protéases ou moins visibles au système immunitaire. Les polypeptides selon l'invention peuvent être obtenus par toute méthode connue de l'homme du métier, et notamment par synthèse chimique, par exemple au moyen de synthétiseurs de peptides, ou par fragmentation ou

délétion à partir de polypeptides, naturels ou non, de taille supérieure. Ils peuvent en outre être préparés par les techniques de l'ADN recombinant, par expression, dans un hôte cellulaire eucaryote ou procaryote, d'un acide nucléique correspondant. Ils peuvent bien entendu résulter de combinaisons 5 de ces différentes méthodes.

Le terme "motif peptidique unique" signifie que, contrairement aux anticorps ou aux fragments d'anticorps de type Fab ou F(ab')2 par exemple, les polypeptides de l'invention ne comportent qu'une seule chaîne d'acides aminés. Le terme "motif peptidique répété" désigne le fait que les 10 polypeptides de l'invention peuvent comporter différents blocs peptidiques assemblés entre-eux, éventuellement par voie chimique, pour ne former qu'une seule chaîne.

Le terme "pénétrer" ou "pénétrant" désigne au sens de l'invention un polypeptide capable de passer depuis le milieu extérieur jusque dans le milieu 15 intracellulaire, notamment dans le cytoplasme de la cellule. Cette capacité peut se déterminer de différentes façons, et notamment selon un test de pénétration cellulaire comportant une première incubation du polypeptide étudié en présence de cellules en culture, suivie, après fixation et perméabilisation de ces cellules, d'une révélation de la présence dudit 20 polypeptide à l'intérieur de ladite cellule. La révélation peut être réalisée par une autre incubation avec des anticorps marqués dirigés contre ledit polypeptide et détection, dans le cytoplasme ou à proximité immédiate du noyau ou même au sein de celui-ci, de la réaction immunologique du type antigène-anticorps entre le polypeptide et l'anticorps marqué. La révélation 25 peut également être réalisée en utilisant un polypeptide de l'invention préalablement marqué et détection de la présence dudit marquage dans ces compartiments cellulaires. Un tel test de pénétration cellulaire a été décrit par exemple dans la demande n° FR N° 9508316, publiée sous le n° 2 736 642.

Comme indiqué ci-dessus, la présente invention résulte de la mise en 30 évidence de l'existence de régions réduites d'un anticorps douées de propriétés de pénétration cellulaire et pouvant également jouer le rôle de

véhicule pour des substances d'intérêt. Plus particulièrement, les inventeurs ont recherché dans la structure de certains anticorps dits pénétrants tels que ceux décrits dans la demande FR N° 95 08316, la présence de régions douées de propriétés de pénétration cellulaire et qui pourraient être utilisées 5 comme vecteur à la place des anticorps entiers. Pour cela, les inventeurs ont, dans un premier temps, déterminé la séquence complète des chaînes lourdes et légères de trois anticorps monoclonaux particuliers, désignés J20.8, F4.1 et F14.6. Ces anticorps sont des anticorps anti-ADN, polyréactifs, qui sont produits par les hybridomes déposés à la CNCM sous les numéros I-1605, I- 10 1606 et I-1607 (voir demande de brevet FR N° 9508316). L'alignement de ces séquences et leur analyse comparative ont fait apparaître les éléments remarquables suivants :

- L'existence d'une région de très forte homologie (65-70 %) dans la région CDR2 de ces trois anticorps, et,
- 15 - La présence, dans ces trois anticorps, de régions CDR3 riches en lysine et arginine (acides aminés basiques).

A la vue des ces résultats, et étant donné que la plupart des peptides capables de transport et de localisation nucléaire sont riches en lysine et arginine, les demandeurs ont ensuite synthétisé des séries de polypeptides 20 correspondant à différentes régions de ces anticorps, et notamment aux régions CDR2 et CDR3, ainsi que des constructions hybrides dans lesquelles certaines de ces régions sont fusionnées entre elles (en particulier un polypeptide CDR2-3 portant successivement les régions CDR2 et CDR3). Un résidu biotine a par ailleurs été introduit du côté N-terminal de ces 25 polypeptides, ce qui permet leur détection aisée.

Ces polypeptides ont ensuite été testés pour leur capacité à pénétrer dans les cellules. Les résultats obtenus montrent, de manière tout à fait remarquable, que certains de ces polypeptides possèdent la capacité de pénétrer efficacement dans les cellules. En particulier, les résultats obtenus 30 montrent que l'ensemble des polypeptides qui comprennent tout ou une partie de la région CDR3 sont capables de pénétrer dans les cellules.

Plus préférentiellement, les polypeptides de l'invention sont donc constitués d'une chaîne unique comprenant un fragment de la chaîne lourde d'un anticorps. Encore plus préférentiellement, ils comprennent un fragment de la région variable de la chaîne lourde d'un anticorps.

5 Selon un mode de réalisation plus particulier, l'invention est relative à des polypeptides tels que définis ci-dessus comprenant tout ou une partie de la région CDR3 d'un anticorps.

Par ailleurs, les résultats obtenus ont également montré que des polypeptides possédant en outre tout ou une partie de la région CDR2 10 possédaient également la capacité de pénétrer dans les cellules. A cet égard, des polypeptides dans lesquels sont combinées tout ou partie de la région CDR3 et tout ou partie de la région CDR2 possèdent des capacités de pénétration cellulaire tout à fait remarquables.

Ainsi, selon un autre mode particulier de réalisation, les polypeptides 15 de l'invention comprennent tout ou une partie de la région CDR2 d'un anticorps.

Selon un mode de mise en œuvre particulièrement intéressant, les polypeptides de l'invention comprennent plus préférentiellement tout ou une partie de la région CDR3 et tout ou une partie de la région CDR2. Ce type de 20 polypeptide est particulièrement avantageux car il est capable de pénétrer massivement à l'intérieur de cellules vivantes.

L'expression "tout ou une partie" telle qu'utilisée dans la présente demande désigne plus particulièrement le fait que les polypeptides de l'invention peuvent comporter soit l'ensemble de la région CDR concernée 25 d'un anticorps, soit une partie seulement de celle-ci, étant entendu que le polypeptide conserve la capacité de pénétrer dans les cellules (homologue fonctionnel). Une partie de région CDR peut notamment consister en une région CDR dépourue de un ou plusieurs acides aminés terminaux, en particulier de un, deux ou trois acides aminés terminaux. Il peut également 30 s'agir d'une région CDR dans laquelle un ou plusieurs résidus internes ont été déletés ou substitués par d'autres acides aminés, de préférence des acides

aminés de même nature (acides aminés basiques par exemple). Avantageusement, moins de 30% des résidus internes de la région CDR sont modifiés, de préférence moins de 20% et encore plus préférentiellement, moins de 15%.

5 Des polypeptides préférés au sens de l'invention sont donc des polypeptides comportant tout ou une partie d'une région CDR3 d'un anticorps. A titre illustratif, on peut citer par exemple les régions CDR3 de séquence SEQ ID N° 1, 2, 3, 8 ou les séquences représentées sur la figure 2 et sur la figure 3, ou tout homologue fonctionnel.

10 Les fragments d'anticorps peuvent constituer à eux seuls un polypeptide de l'invention. Ils peuvent également être modifiés, notamment par addition de résidus à une ou plusieurs de leurs extrémités. En particulier, il peut être avantageux le cas échéant d'ajouter des acides aminés qui vont donner au fragment, notamment à la région CDR, une meilleure configuration 15 spatiale. Il peut en outre être avantageux d'ajouter un ou plusieurs acides aminés essentiellement basiques, de type lysine et/ou arginine, afin de stabiliser le polypeptide et d'augmenter son interaction avec les membranes cellulaires. En outre, comme indiqué ci-dessus, les polypeptides de l'invention peuvent comporter plusieurs régions d'une chaîne d'anticorps, tel que par 20 exemple une région CDR2 et une région CDR3. Ces régions peuvent en particulier être fusionnées entre elles ou espacées d'acides aminés tels que décrits ci-dessus.

Des polypeptides particuliers au sens de l'invention sont notamment les polypeptides comprenant une région CDR3 d'anticorps ou les polypeptides 25 comprenant essentiellement une fusion entre la région CDR3 d'un anticorps et la région CDR2 d'un anticorps. Des exemples de tels polypeptides sont notamment les polypeptides CDR3 et le polypeptide CDR2-3 dont les séquences sont données dans les exemples. Une région CDR2 particulièrement préférée au sens de l'invention est représentée par la 30 séquence suivante ( $m = 0$  ou  $1$ ), ou toute séquence présentant une homologie supérieure à 50%, de préférence 65% avec celle-ci.

(Val)<sub>m</sub>-(Ala)<sub>m</sub>-Tyr-Ile-Ser-Arg-Gly-Gly-Val-Ser-Thr-Tyr-Tyr-Ser-Asp-Thr-  
Val-Lys-Gly-(Arg)<sub>m</sub>-(Phe)<sub>m</sub> = SEQ ID N° 4

5 Les expériences réalisées avec ces polypeptides, notamment les polypeptides comportant la région CDR3, et en particulier ceux comportant la région CDR3 et la région CDR2, montrent de façon claire que :

10 1) une incubation d'une heure, de cellules PtK2, HeLa ou 3T3 avec le milieu de culture complet (10% de sérum de veau foetal) contenant le polypeptide est suffisante pour que le polypeptide soit transporté massivement dans le cytoplasme de toutes les cellules et dans le noyau d'une grande proportion de ces cellules.

15 2) quand on incube pendant 2 heures les cellules dans le milieu de culture complet contenant des complexes préformés peptide-streptavidine couplée à la peroxydase (PM ≥ 100.000) ou peptide-streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (PM ≥ 180.000), on détecte les enzymes correspondants au niveau du cytoplasme de toutes les cellules de la culture et  
20 faiblement jusqu'à intensément dans la majorité des noyaux de ces cellules. Aucune coloration intracellulaire n'est observée quand les cellules sont incubées en présence de streptavidine couplée à la peroxydase, streptavidine couplée à la phosphatase alcaline ou avec la streptavidine ou les enzymes sous leurs formes natives.

25 Les polypeptides de l'invention notamment de type CDR3 et CDR2-3 ainsi que leurs complexes peptide-streptavidine-enzyme sont transportés en grandes quantités dans une large proportion des cellules périphériques humaines et particulièrement dans les lymphocytes T activés.

D'une manière générale, les polypeptides selon l'invention peuvent être  
30 construits selon différentes techniques connues de l'homme du métier (supra),

en partant de tout anticorps donné, notamment de tout anticorps monoclonal donné.

Préférentiellement, les polypeptides de l'invention sont obtenus par synthèse chimique ou sont construits à partir d'un fragment ou plusieurs 5 fragments d'un ou plusieurs anticorps pénétrant(s), de préférence d'un anticorps monoclonal pénétrant. L'existence d'anticorps capables de pénétrer à l'intérieur des cellules et en particulier de noyaux de lymphocytes humains lorsque ces cellules sont incubées *in vitro* dans un milieu de culture contenant un sérum provenant de malades atteints de lupus érythémateux disséminé (LED), a été 10 rapportée pour la première fois par Alarcon-Segovia et al. en 1978 (*Nature*, 271). Récemment, ce type d'anticorps a été détecté chez la souris lupique MRL Ipr/Ipr, mais également chez la souris NZB présentant un syndrome de maladie hémolytique autoimmune et même chez la souris normale BALB/c. Certains 15 anticorps monoclonaux, préparés à partir de la rate de ces souris, se sont avérés capables de pénétrer *in vitro* dans le noyau de cellules maintenues en culture (Vlahakos et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 2 (1992) 1345; Eyal Raz et al., *Eur. J. Immunol.* 23 (1993) 383). De plus, il a été montré que ces anticorps sont aussi capables, lorsqu'ils sont injectés chez la souris, de pénétrer dans plusieurs types 20 de cellules, pour se retrouver dans leurs noyaux (Okudaira et al., *Arthritis and Rheumatism*, 30 (1987) 669).

De manière générale, tout anticorps peut être sélectionné en vue de déterminer son caractère pénétrant. En particulier, cette sélection peut être réalisée par exemple par un test de pénétration cellulaire comportant une première incubation de l'anticorps étudié en présence de cellules, notamment de 25 cellules dans lesquelles il est envisagé de véhiculer une substance d'intérêt, suivie après fixation et perméabilisation de ces cellules, de la révélation de la présence ou non de cet anticorps dans le cytoplasme ou à proximité immédiate du noyau ou même au sein de celui-ci dudit anticorps. La révélation peut être réalisée par exemple par incubation avec un deuxième anticorps marqué, dirigé 30 contre l'anticorps testé, suivie de la détection de la réaction immunologique du

type antigène-anticorps entre ces deux anticorps. Un tel test a été décrit en détail par exemple dans la demande de brevet n° FR N°9508316.

Encore plus préférentiellement, le fragment d'anticorps utilisé pour la construction d'un polypeptide de l'invention est un fragment d'un anticorps 5 polyréactif, notamment pénétrant et polyréactif. Un anticorps polyréactif est un anticorps capable de reconnaître plusieurs antigènes différents. Généralement, de tels anticorps ont une affinité particulièrement élevée pour un type d'antigène particulier et sont capables de reconnaître, avec une affinité moindre, un ou plusieurs autres antigènes. La polyréactivité des 10 anticorps peut être mise en évidence par toute méthode immunologique classique, telle que par exemple la méthodologie décrite par Sibille et al. (Eur. J. Immunol. 1997, 27:1221-1228).

De manière avantageuse, les anticorps polyréactifs utilisés dans la construction des polypeptides de l'invention sont capables de réagir avec des 15 acides nucléiques, libres ou complexés avec des protéines. Encore plus préférentiellement, il s'agit d'anticorps capables de réagir avec des acides nucléiques et reconnaissant entre autres des protéines telles que Tat ou Rev du rétrovirus VIH, et/ou des marqueurs de surface tels que CD3, CD4, CD8, CD19 ou CD34.

20 Pour la construction d'un polypeptide de l'invention, l'anticorps ainsi retenu est ensuite utilisé comme suit :

a) si la séquence de la région variable de la chaîne lourde ou légère de cet anticorps n'est pas accessible, celle-ci est dans un premier temps déterminée. Pour cela, les techniques classiques de séquençage 25 peuvent être mises en oeuvre, comme illustré dans les exemples.

b) les régions CDRs sont localisées par alignement de la séquence avec d'autres séquences de chaînes d'anticorps,

c) des fragments de cette séquence sont préparés, ou, des polypeptides correspondants à des régions de cette séquence sont 30 synthétisés. Pour cela, toute technique classique connue de l'homme du

métier peut être utilisée (séquenceurs de peptides, utilisation d'enzyme de restriction, de ligases, etc).

d) le fragment ainsi obtenu est éventuellement modifié par addition, délétion ou substitution d'acides aminés,

5 e) la capacité du polypeptide ainsi obtenu de pénétrer dans les cellules est ensuite testée dans les conditions décrites plus haut.

Eventuellement, les étapes c), d) et e) ou d) et e) sont répétées de manière à améliorer l'efficacité de pénétration ou les propriétés générales des polypeptides de l'invention.

10 Dans une étape supplémentaire ultérieure f), le polypeptide ainsi obtenu, ayant la capacité de pénétrer dans les cellules, est ensuite utilisé dans une réaction de couplage avec une substance donnée pour générer un vecteur tel que défini ci-après.

Préférentiellement, dans l'étape c), les fragments préparés comportent 15 tout ou une partie de la région CDR3 d'un anticorps.

Dans l'étape d), les modifications peuvent consister par exemple à introduire certains acides aminés supplémentaires, soit simplement pour des raisons techniques (facilité de synthèse, couplage entre différentes régions, etc) soit pour des raisons structurales ou physicochimiques. S'agissant

20 d'acides aminés de "remplissage", on utilise avantageusement des acides aminés relativement neutres sur le plan structural et physicochimique.

S'agissant de raisons structurales, comme indiqué ci-avant, l'addition de résidus peut améliorer la conformation du polypeptide et ainsi, potentialiser son activité. Par ailleurs, il peut également être souhaitable d'augmenter le 25 caractère basique des polypeptides.

A cet égard, pour améliorer les propriétés de compaction des polypeptides de l'invention, notamment vis-à-vis des acides nucléiques, tout en laissant libre le site actif de l'anticorps, des polypeptides ont été construits comprenant un fragment d'anticorps et des résidus lysine. Plus

30 particulièrement, des polypeptides ont été construits comportant un fragment d'anticorps portant tout ou partie d'un CDR3, et une polylysine.



Avantageusement, le nombre de résidus lysine est inférieur à 30, encore plus préférentiellement, inférieur à 20.

Les résultats présentés dans les exemples confirment les propriétés de pénétration de ces polypeptides, et leur capacité à véhiculer efficacement des 5 substances d'intérêt, notamment des acides nucléiques.

Quels que soient les ajouts effectués, le polypeptide selon l'invention tel que préparé par exemple selon la stratégie décrite ci-dessus comporte préférentiellement au plus 100 acides aminés. Encore plus préférentiellement, il comprend de 3 à 60 acides aminés et, de préférence, de 3 à 30 acides 10 aminés.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un polypeptide tel que défini ci-dessus pour le transfert de substances dans les cellules, *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*.

Un autre objet de l'invention concerne un vecteur pour le transfert d'une 15 substance dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide tel que défini ci-dessus auquel est couplée ladite substance.

La substance couplée peut être tout produit d'intérêt, notamment pharmaceutique ou agro-alimentaire. Il peut s'agir en particulier d'un acide nucléique, tel que par exemple un acide ribonucléique ou un acide 20 désoxyribonucléique. Cet acide nucléique peut en outre être d'origine diverses, et notamment humaine, virale, animale, eucaryote ou procaryote, de plante, synthétique, etc. Cet acide nucléique peut par ailleurs avoir une taille variable, allant du simple oligonucléotide au génome ou fragment de génome. Il peut s'agir notamment d'un génome viral ou d'un plasmide. La substance 25 peut également être une protéine, telle que par exemple une enzyme, hormone, cytokine, apolipoprotéine, facteur de croissance, etc. Un type particulier de substance est représenté par les antigènes. Comme indiqué ci-après, les polypeptides de l'invention permettent en effet, de manière avantageuse, de jouer le rôle d'adjuvant et de stimuler la réponse immunitaire 30 dirigée contre un antigène.

De manière plus générale, la substance peut être tout principe actif de médicament, qu'il s'agisse d'un produit chimique, biochimique ou synthétique.

Pour permettre son transfert dans une cellule, ladite substance est donc couplée à un polypeptide de l'invention.

5 Le terme "couplé" signifie au sens de l'invention tout type d'interaction permettant une association physique entre la substance et le polypeptide. Il est préférable cependant que l'interaction soit suffisamment stable pour que le vecteur ne se dissocie pas avant la pénétration cellulaire. Pour cette raison, un couplage préféré au sens de l'invention est un couplage covalent.

10 Le couplage covalent peut être réalisé par différentes techniques connues de l'homme du métier. En particulier, il peut s'effectuer par des liaisons de type maléimide, succinimide, peptidique, disulfide et thioether. On peut se référer à l'ouvrage "Bioconjugate Techniques" de Greg. T. HERMANSON (Academic Press, 1996].

15 Une méthode particulière consiste par exemple à ajouter, à une extrémité d'un polypeptide de l'invention, un résidu cystéine qui peut être aisément utilisé pour des liaisons disulfure, amine ou acide. Une autre approche consiste à coupler chimiquement un groupement biotinyl, qui permet de coupler ensuite toute substance liée à la streptavidine. Le couplage peut 20 encore être effectué par l'intermédiaire de la p-benzoquinone (FR N° 7537392 et brevet américain N° 4 925 921 par exemple).

De manière générale, tout procédé de couplage chimique, biochimique, enzymatique ou génétique connu dans la littérature peut être employé.

Par ailleurs, un vecteur selon l'invention peut comporter un polypeptide 25 tel que décrit ci-dessus auquel sont couplées plusieurs substances, identiques ou différentes.

Les exemples présentés ci-après établissent de façon claire que les polypeptides de l'invention possèdent la capacité non seulement de pénétrer dans les cellules, mais également d'y véhiculer des substances d'intérêt. Les 30 exemples montrent notamment le transport de protéines, de type enzyme. Il est entendu que les enzymes peuvent être substituées par toute autre

molécule d'intérêt telle que acides nucléiques, peptides, substances médicamenteuses, dans les mêmes conditions.

D'autre part, le fait que ces polypeptides permettent le transport massif des protéines à l'intérieur des cellules, a par ailleurs incité le demandeur à 5 examiner la possibilité de les utiliser comme agent de transport intracellulaire d'antigènes, leur conférant un effet adjuvant et conduisant à augmenter la réponse immunitaire contre ces antigènes. Ainsi, des souris ont reçu plusieurs injections avec le conjugué streptavidine-peroxydase seul ou complexé avec un polypeptide de l'invention. Les résultats obtenus montrent que l'emploi d'un 10 polypeptide de l'invention permet d'augmenter, en moyenne de 4 à 8 fois le titre des anticorps anti-streptavidine et anti-peroxydase.

Un autre objet de l'invention réside par ailleurs dans une cellule, notamment eucaryote, contenant un polypeptide ou un vecteur tel que défini ci-dessus. Cette cellule est avantageusement une cellule mammifère, 15 notamment une cellule animale ou humaine. Il peut s'agir en particulier d'une cellule du système hématopoïétique, telle qu'une cellule progéniteur ou cellule souche ou une cellule lymphocytaire (T, B). Il peut aussi s'agir de cellules présentatrices de l'antigène telles que par exemple les macrophages ou les cellules dendritiques.

20 A cet égard, l'invention est également relative à un procédé pour transférer une substance dans une cellule *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* comprenant :

- le couplage entre ladite substance et un polypeptide tel que défini ci-avant, et,
- 25 - la mise en contact de la cellule avec le produit dudit couplage.

Pour une utilisation *in vitro* ou *ex vivo*, la mise en contact peut être réalisée par simple incubation des cellules avec le produit du couplage (vecteur). Pour une utilisation *in vivo*, la mise en contact est généralement réalisée par administration du produit du couplage (vecteur) dans l'organisme 30 considéré.

Dans ce but, l'invention est aussi relative à une composition pharmaceutique comprenant, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, un vecteur tel que défini ci-dessus dans lequel la substance est un principe actif de médicament.

5 L'invention concerne encore un vaccin comprenant, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, un vecteur tel que défini ci-dessus dans lequel la substance est un antigène.

La présente invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

10

### Légende des Figures

Figure 1 : Représentation de la structure d'un anticorps.

15 Figure 2 : Séquence peptidique des régions variables de la chaîne lourde d'anticorps monoclonaux pénétrants. Les régions CDR sont représentées. Les "-" représentent des acides aminés identiques.

Figure 3 : Séquence des régions CDR2 et CDR3 des domaines VH d'anticorps anti-ADN pénétrants dans les cellules.

20 Figure 4 : Mise en évidence, par ELISA, de l'effet adjuvant *in vivo* des polypeptides de l'invention.

Figure 5 : Activité de transfection d'ADN du peptide CDR2-3-PL18

### Matériel et méthode.

25 Souris et lignée cellulaires :

Des souris BALB/c (NZB x NZW) F1 ont été maintenues dans l'animalerie de l'Institut Pasteur. Les cellules suivantes d'espèces différentes et de tissus différents sont utilisées : cellules PtK2 (Fibroblastes de rein),  
30 cellules GMA-32 (poumon de hamster), cellules 3T3 (Fibroblastes d'embryon de souris), cellules HeLa (Carcinome Cervix humain), cellules VERO (rein de

singe), cellules HEp-2 (Carcinome de larynx humain), cellules JURKAT et cellules CEM (lymphoblastes T humain) toutes disponibles à la Collection ATCC. Ces différents types cellulaires ont été cultivés en milieu RPMI (à l'exception des cellules GMA-32 qui sont cultivées en milieu DMEM) 5 contenant 10 % de sérum de veau foetal inactivé et supplémenté par de la L-glutamine, du pyruvate de sodium et des acides aminés non-essentiels ainsi que des antibiotiques (milieu de culture complet) à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO<sub>2</sub>.

10           Anticorps monoclonaux

La préparation et l'isolement des anticorps monoclonaux J20.8, F4.1 et F14.6 ont été décrit dans la demande de brevet FR N° 9508316.

15           Ces anticorps ont été purifiés sur colonne de protéine A Sépharose (Ey et al., Immunochemistry 15 (1978) 429). La polyréactivité de ces anticorps purifiés, vis-à-vis de l'ADN double-brin d'une part et d'autre antigènes d'autre part a été testée par ELISA en utilisant des méthodologies décrites dans la littérature (Guilbert et al., J. Immunol. 128 (1982) 2779).

20

Exemples

1. Séquençage des anticorps monoclonaux

25           La séquence nucléotidique des régions VH et VL des anticorps monoclonaux J20.8, F4.1 et F14.6 a été déterminée. Pour cela, l'ARN total a été extrait des cellules d'hybridomes en utilisant la technique de thiocyanate de guanidine (Schwartz et al., Biol. Cell. 73 (1991) 7) puis séparé par électrophorèse sur un gel de formaldehyde/Agarose. Les ARN messagers 30 ainsi obtenus ont ensuite été transformés en ADN complémentaires en utilisant un kit de transcriptase reverse (Life Technologies, Eragny, France) et

utilisés comme amorce dans des réactions d'amplification (PCR) en utilisant l'ADN polymérase Taq (Boehringer, Mannheim, FRG) en suivant les recommandations du fabricant. Les amores oligonucléotidiques utilisées pour générer les ADN complémentaires sont :

5

- d'une part une amorce correspondant aux séquences conservées des immunoglobulines IgG2a :

5'-GTTCTGACTAGTGGGCACCTCTGGGCT (SEQ ID n° 11)

10

- et d'autre part, quatre amores pour la région VH :

5'-GAGGTTCAGCTCGAGCAGTCTGGGGC (SEQ ID n° 12)

5'-GAGGTGAAGCTCGAGGAATCTGGAGG (SEQ ID n° 13)

5'-GAAGTGCAGCTCGAGGAGTCTGGGG (SEQ ID n° 14)

5'- GAGGTTCAGCTCGAGCAGTCTGGAGC (SEQ ID n° 15)

15

Les produits d'amplification par PCR ont ensuite été purifiés en utilisant le kit Geneclean (Bio 101, Vista, CA). Le séquençage chimique a été réalisé par Genome express (Grenoble, France). Les séquences nucléotidiques ont été analysées en utilisant les banques de données GENBANK et EMBL 20 conservées à L'Institut Pasteur (Unité d'Informatique Scientifique) en utilisant le logiciel d'analyse des séquences (GCG) (Devereux J., The GCG Sequence Analysis Software Package, 1989), et les séquences d'acides aminés correspondantes ont été déduites.

25

La séquence des régions VH de ces anticorps est représentée sur la Figure 2. L'alignement de ces séquences permet de localiser les régions CDR présentes dans ces séquences (CDR1, CDR2 et CDR3). Cet alignement permet en outre de mettre en évidence l'existence d'une homologie structurale importante entre les régions CDR2 et de caractéristiques structurales 30 communes entre les régions CDR3, notamment la présence de résidus

basiques (arginine et lysine). Les séquences de régions CDR2 et CDR3 d'autres anticorps sont présentées sur la figure 3.

## 2. Construction de polypeptides pénétrants

5

A partir des séquences présentées sur la figure 1, différents polypeptides comportant tout ou une partie de la région CDR3 et/ou de la région CDR2 des anticorps ont été préparés. La synthèse a été réalisée par des synthétiseurs de peptides (Cf matériel et méthodes). Les polypeptides suivants sont synthétisés, dans lesquels m vaut 1 ou 0 :

10

### CDR3 :

#### SEQ ID N° 1 :

15

(Thr)<sub>m</sub>-(Arg)<sub>m</sub>-(Gln)<sub>m</sub>-Lys-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ala-(M-D-Y-W-G-Q-G-T)m

Une variante de cette séquence est par exemple la séquence TRQKYNKRA(MDYWGQGT)m. Une autre variante (homologue fonctionnel) est par exemple la séquence Ala-Arg-Gln-Lys-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ala-Met-Asp-Tyr (SEQ ID n° 8).

20

#### SEQ ID n° 2 :

(Thr)<sub>m</sub>-(Arg)<sub>m</sub>-(Gln)<sub>m</sub>-Lys-Tyr-Gly-Lys-Arg-Gly-(M-D-Y-W-G-Q-G-T)m

Une variante de cette séquence est par exemple la séquence TRQKYNKKRG(MDYWGQGT)m.

25

#### SEQ ID n° 3 :

(Thr)<sub>m</sub>-(Arg)<sub>m</sub>-(Gln)<sub>m</sub>-Ala-Arg-Ala-Thr-Trp-Asp-Trp-(F-A-Y-W-G-Q-G-T)m

Une variante de cette séquence est par exemple la séquence 30 TRGARATWDW(FAYWGQGT)m.

Dans les séquences 1-3 ci-dessus, MDYWGQGT = Met-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr et FAYWGQGT = Phe-Ala-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr. En outre, la formule (a-b-c)m signifie que un seul, plusieurs ou tous les résidus mentionnés dans la parenthèse sont présents ou non.

5

### CDR2 :

#### SEQ ID n° 4 :

(Val)<sub>m</sub>-(Ala)<sub>m</sub>-Tyr-Ile-Ser-Arg-Gly-Gly-Val-Ser-Thr-Tyr-Tyr-Ser-Asp-Thr-  
10 Val-Lys-Gly-(Arg)<sub>m</sub>-(Phe)<sub>m</sub>-(Thr)<sub>m</sub> (CDR2(1)). Une variante de cette séquence est par exemple la séquence VAYISRGGVSTYYSDTVKGRF ou VAYISRGGVSTYYSDTVKGRFT.

#### SEQ ID n° 5 :

15 (Val)<sub>m</sub>-(Ala)<sub>m</sub>-Tyr-Ile-Ser-Arg-Gly-Gly-Ile-Phe-Tyr-Tyr-Glu-Asp-Ser-Ile-Lys-Gly-(Arg)<sub>m</sub>-(Phe)<sub>m</sub> (CDR2(2)). Une variante de cette séquence est par exemple la séquence VAYISRGGIFYYQDSIKGRF.

#### SEQ ID n° 6 :

20 (Val)<sub>m</sub>-(Ala)<sub>m</sub>-Ala-Ile-Ser-Arg-Gly-Gly-Tyr-Ser-Tyr-Tyr-Leu-Asp-Ser-Val-Lys-Gly-(Arg)<sub>m</sub>-(Phe)<sub>m</sub>-(Thr)<sub>m</sub>-(Ile)<sub>m</sub> (CDR2(3)). Une variante de cette séquence est par exemple la séquence VAAISRGGGYSYYLDSVKGRFTI

### CDR2-3 :

25

#### SEQ ID n° 7 :

Val-Ala-Tyr-Ile-Ser-Arg-Gly-Gly-Val-Ser-Thr-Tyr-Tyr-Ser-Asp-Thr-Val-Lys-Gly-Arg-Phe-Thr-Arg-Gln-Lys-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ala. Une variante de cette séquence est par exemple la séquence  
30 VAYISRGGVSTYYSDTVKGRFTRQKYNKRAVAY.

CDR2-3 fonctionnalisé :

Biotinyl-Val-Ala-Tyr-Ile-Ser-Arg-Gly-Gly-Val-Ser-Thr-Tyr-Tyr-Ser-Asp-Thr-Val-Lys-Gly-Arg-Phe-Thr-Arg-Gln-Lys-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ala-

5 (correspondant à la séquence SEQ ID n° 7)

Cys-Val-Ala-Tyr-Ile-Ser-Arg-Gly-Gly-Val-Ser-Thr-Tyr-Tyr-Ser-Asp-Thr-Val-Lys-Gly-Arg-Phe-Thr-Arg-Gln-Lys-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ala- (SEQ ID n° 9).

10 Dans la séquence SEQ ID n° 9, on introduit par la cystéine un groupement actif (SH), pour faire le couplage à une autre substance.

CDR2 fonctionnalisé :

15 Biotinyl-VAYISRGGVSTYYSDTVKGRFT (Biotinyl-Val-Ala-Tyr-Ile-Ser-Arg-Gly-Gly-Val-Ser-Thr-Tyr-Tyr-Ser-Asp-Thr-Val-Lys-Gly-Arg-Phe-Thr), correspondant à la séquence SEQ ID n° 4.

CDR3 fonctionnalisé :

20 Biotinyl-Ala-Arg-Gln-Lys-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ala-Met-Asp-Tyr (correspondant à la séquence SEQ ID n° 8).

3. Etude de la Pénétration des polypeptides dans les cellules

25 Des fibroblastes PtK2 en culture, ensemencées la veille à raison de  $5 \times 10^4$  cellules par puits sur des lamelles de verre, sont incubées à 37°C, 1-18 heures dans du milieu de culture RPMI 1640 (ou DMEM) complet (10% de sérum de veau foetal, 2 mM L-glutamine et 1 mM pyruvate de sodium)

30 contenant un polypeptide de l'invention biotinylé (5-20 µg/ml). Les cellules

sont ensuite lavées avec du PBS et fixées avec 2% de p-formaldehyde à 4°C pendant 10 minutes puis lavées avec du PBS.

Les cellules sont ensuite incubées avec une solution de streptavidine 5 conjuguée à la peroxydase à 5 µg/ml dans le PBS pendant 30 minutes, puis lavées au PBS et incubées dans le substrat cytochimique de la peroxydase (diaminobenzidine + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Après lavage, les cellules sont examinées au microscope.

10 Les résultats obtenus montrent que, après 1 heure de culture, les polypeptides comportant tout ou partie d'un CDR3 sont visibles par la coloration de la peroxydase dans le cytoplasme de toutes les cellules et dans le noyau d'un grand nombre de cellules. Les résultats montrent en outre que le polypeptide CDR2-3 pénètre massivement et rapidement dans les cellules, 15 et atteint en majorité le noyau desdites cellules. Ces résultats montrent donc qu'il est possible, à partir d'une fragment de type CDR3, de générer des polypeptides ayant une capacité élevée de pénétration cellulaire.

20 4. Pénétration des vecteurs polypeptide-streptavidine couplée aux enzymes dans les cellules.

Cet exemple illustre comment les polypeptides de l'invention peuvent être couplés à une substance active, et utilisés pour véhiculer ladite substance dans les cellules.

25 Les vecteurs sont préparés en incubant 1,4 µg de polypeptide CDR2-3 biotinylé avec 10 µg de streptavidine conjuguée à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline dans un volume de 10 µl pendant 15 minutes à la température du laboratoire. Le mélange est ensuite dilué dans 0.5 ml de culture complet avant d'être déposé sur les cellules en culture. Après 2 heures 30 de culture, les cellules sont lavées au PBS, fixées au p-paraformaldehyde, lavées puis incubée dans le substrat cytochimique de la peroxydase

(diaminobenzidine + H<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>) ou celui de la phosphatase alcaline (Naphtol AsMx + le sel de tetrazolium Fast Red).

Les résultats obtenus montrent que l'on détecte les enzymes correspondants au niveau du cytoplasme de toutes les cellules de la culture et faiblement jusqu'à intensément dans la majorité des noyaux de ces cellules. En revanche, aucune coloration intracellulaire n'est observée quand les cellules sont incubées en présence de streptavidine couplée à la peroxydase, streptavidine couplée à la phosphatase alcaline ou avec la streptavidine ou les enzymes sous leurs formes natives.

5. Construction et activité d'un polypeptide comportant des résidus lysine supplémentaires.

15 Un polypeptide CDR2-3-PL19 (polylysine) a été synthétisé et purifié (ALTERGEN). La séquence de ce polypeptide est la suivante :

(NH<sub>2</sub>-(K19)-VAYISRGGVSTYYSDTVKGRFTRQKYNKRA-COOH)  
SEQ ID n° 10.

20 Les cellules CCL39 (fibroblastes de Hamster) ( $5 \times 10^4$  cellules) sont mises dans des plaques de cultures 24 puits 18 heures avant la transfection dans du milieu de culture MEM + 10% SVF (sérum de veau foetal). Les transfections sont réalisées dans du MEM + 10% SVF sans aucun autre agent auxilliaire (CHLOROQUINE). Le peptide-PL et la polylysine libre PL (correspondant à 19 lysines) sont complexés avec le plasmide pCMVLUC (respectivement à 24 µg et 70 µg pour 6 µg de plasmide) pendant 30 minutes. Puis le complexe est ajouté goutte à goutte sur les CCL39. Après 5 heures d'incubation, le milieu est remplacé par du milieu frais. L'expression de la luciférase est déterminée 24 heures après. Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS. Après le lavage les cellules sont lysées avec 100 µl de tampon

de lyse (PROMEGA) pendant 10-15 minutes. Les cellules sont ensuite centrifugées 7 minutes à 4°C pour enlever les débris cellulaires. 20 µl de ce lysat est mélangé avec 100 µl du tampon luciférase (PROMEGA). Les unités relatives de la luciférase (RLU) sont enregistrées sur un LUMAT LB9501 5 (BERTHOLD). La concentration des protéines est déterminée par le Kit BIORAD PROTEIN ASSAY-1 et le taux de luciférase dans chaque échantillon est normalisé par mg de protéine, chaque transfection étant réalisée trois fois.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 4. Ils montrent que 10 le peptide-PL transfecte en milieu complet et sans aucun agent auxiliaire avec une efficacité de  $2 \times 10^6$  RLU/mg de protéines soit environ 1000 fois plus que la polylysine seule et autant qu'un peptide récemment décrit (Wadhwa et al., Bioconjugate Chem. 1997, 8:81-88.), mais dont l'activité est dépendante de la présence de 100µM de chloroquine.

15

La transfection des cellules par le polypeptide CDR-2-3-polylysine 19 est donc particulièrement avantageuse puisqu'elle peut être réalisée dans un milieu de culture complet et en absence d'agent auxiliaire. Actuellement les systèmes de transfection utilisant la polylysine nécessitent tous l'addition 20 d'agent auxiliaire, le plus souvent la chloroquine qui est toxique pour les cellules. Cette chloroquine permet d'éviter la dégradation dans les lysosomes des complexes conjugués-polylysine internalisés par la voie classique d'endocytose.

25 La présente invention, au contraire, ne nécessite pas l'emploi de tels agents auxiliaires.

#### 6. Utilisation d'un polypeptide comme immunoadjuvant.

30 Le vecteur est formé en laissant en incubation pendant 15 minutes 14 µg de polypeptide CDR2-3 biotinylé + 40 µg de streptavidine conjuguée à la

peroxydase (Sigma) puis dilué dans 0.1 ml de PBS avant d'être injecté à chaque souris. L'injection se fait dans les coussinets plantaires. Les souris témoins reçoivent 40 µg de streptavidine conjuguée à la peroxydase dans 0,1 ml de PBS.

5

Les souris sont saignées toutes les semaines. Une injection de rappel est effectuée dans les mêmes conditions un mois après la première injection. Par un test ELISA, on observe que les souris ayant reçu le complexe CDR2-3-streptavidine conjuguée à la peroxydase répondent en anticorps IgG anti-streptavidine et anti-peroxydase, mais très peu en IgM, avec des valeurs nettement plus élevées que celles qui ont reçu la streptavidine conjuguée à la peroxydase seule et ceci dès le 14ème jour (Figure 4). L'injection de rappel entraîne une augmentation du titre en anticorps dans les deux groupes, mais les valeurs sont toujours supérieures dans le groupe ayant reçu le complexe.  
10 Sur la base de ces résultats, il apparaît donc que dans les conditions testées, les polypeptides de l'invention sont capables d'augmenter, d'un facteur 4 à 8 au moins, le titre des anticorps dirigés contre un antigène donné.

Les mêmes expériences peuvent être reproduites en utilisant comme  
20 antigène non plus une protéine, mais un acide nucléique codant pour ledit antigène. Par ailleurs, ces expériences peuvent également être répétées dans les mêmes conditions avec un polypeptide comportant des résidus basiques supplémentaires, notamment une polylysine.

25 L'ensemble de ces résultats démontre clairement que les polypeptides de l'invention, comportant une région d'un anticorps, de préférence comportant tout ou partie d'un CDR3, sont capables (i) de pénétrer efficacement dans les cellules (ii) d'y véhiculer des substances, en particulier de taille importante, et (iii), de jouer le rôle d'adjuvant *in vivo* en stimulant la  
30 réponse immunitaire contre un antigène donné. En outre, les polypeptides de l'invention semblent même pouvoir transporter des substances jusqu'au noyau

des cellules, ce qui représente un intérêt évident lorsque les substances sont des acides nucléiques ou des molécules agissant sur les acides nucléiques. Par ailleurs, les polypeptides de l'invention semblent utiliser un mécanisme de pénétration cellulaire différent de la plupart des vecteurs utilisés jusqu'à 5 présent. En particulier, les polypeptides de l'invention semblent échapper aux lysosomes, ce qui constitue un avantage supplémentaire dans la mesure où un phénomène de dégradation important se produit généralement dans ces compartiments cellulaires.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide caractérisé en ce que :
  - il est constitué d'un motif peptidique unique ou répété,
  - il comprend une séquence d'amino-acide constituée d'un ou plusieurs fragment(s) différent(s) d'anticorps, et,
  - il est capable de pénétrer dans les cellules.
- 5 2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend un fragment de la chaîne lourde d'un anticorps.
- 10 3. Polypeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou une partie de la région CDR3 d'un anticorps.
4. Polypeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou une partie de la région CDR2 d'un anticorps.
- 15 5. Polypeptide selon la revendication 3 ou 4 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou une partie de la région CDR3 et tout ou une partie de la région CDR2 d'un anticorps.
6. Polypeptide selon la revendication 5 caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement en une fusion entre la région CDR3 d'un anticorps et la région CDR2 d'un anticorps.
- 20 7. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend au plus 100 acides aminés.
8. Polypeptide selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il comprend de 3 à 60 acides aminés et, de préférence, de 3 à 30 acides aminés.
- 25 9. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le fragment d'anticorps est un fragment d'un anticorps capable de pénétrer dans les cellules.
10. Polypeptide selon la revendication 9 caractérisé en ce que le fragment d'anticorps est un fragment d'un anticorps polyréactif.
- 30 11. Polypeptide selon la revendication 10 caractérisé en ce que le fragment d'anticorps est un fragment d'un anticorps anti-ADN.

*feuille avant rectification*

12. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend une région de séquence choisie parmi les séquences SEQ ID n° 1, 2, 3 et 8 ou tout homologue fonctionnel.
13. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est en 5 autre capable de faire pénétrer une substance dans une cellule.
14. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes pour le transfert de substances dans les cellules.
15. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 caractérisé en ce qu'il est couplé à une substance.
- 10 16. Vecteur pour le transfert d'une substance dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 auquel est couplée ladite substance.
17. Vecteur selon la revendication 16 caractérisé en ce que le couplage est un couplage covalent.
- 15 18. Vecteur selon la revendication 17 caractérisé en ce que le couplage est réalisé par une liaison de type maléimide, succinimide, peptidique, disulfure, amine, acide, biotine-streptavidine ou p-benzoquinone.
19. Vecteur selon la revendication 16 caractérisé en ce que ladite substance est un acide nucléique.
- 20 20. Vecteur selon la revendication 16 caractérisé en ce que ladite substance est une protéine.
21. Vecteur selon la revendication 16 caractérisé en ce que ladite substance est un médicament.
- 25 22. Vecteur selon la revendication 16 caractérisé en ce que ladite substance est un antigène.
23. Cellule eucaryote contenant un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.
24. Cellule eucaryote contenant un vecteur selon la revendication 16.
25. Procédé pour transférer une substance dans une cellule *in vitro* 30 comprenant :



- le couplage entre ladite substance et un polypeptide selon la revendication 1 et,

- l'incubation de la cellule avec le produit dudit couplage.

26. Composition pharmaceutique comprenant, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, un vecteur selon la revendication 16 dans lequel la substance est un principe actif de médicament.

27. Vaccin comprenant, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, un vecteur selon la revendication 16 dans lequel la substance est un antigène.

12. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend une région de séquence choisie parmi les séquences SEQ ID n° 1, 2, 3 et 8 ou tout homologue fonctionnel.

13. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est en 5 autre capable de faire pénétrer une substance dans une cellule.

14. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes pour la préparation d'une composition destinée au transfert de substances dans les cellules.

15. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 10 caractérisé en ce qu'il est couplé à une substance.

16. Vecteur pour le transfert d'une substance dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 auquel est couplée ladite substance.

17. Vecteur selon la revendication 16 caractérisé en ce que le couplage 15 est un couplage covalent.

18. Vecteur selon la revendication 17 caractérisé en ce que le couplage est réalisé par une liaison de type maléimide, succinimide, peptidique, disulfure, amine, acide, biotine-streptavidine ou p-benzoquinone.

19. Vecteur selon la revendication 16 caractérisé en ce que ladite 20 substance est un acide nucléique.

20. Vecteur selon la revendication 16 caractérisé en ce que ladite substance est une protéine.

21. Vecteur selon la revendication 16 caractérisé en ce que ladite substance est un médicament.

25 22. Vecteur selon la revendication 16 caractérisé en ce que ladite substance est un antigène.

23. Cellule eucaryote contenant un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

24. Cellule eucaryote contenant un vecteur selon la revendication 16.

30 25. Procédé pour transférer une substance dans une cellule in vitro comprenant :

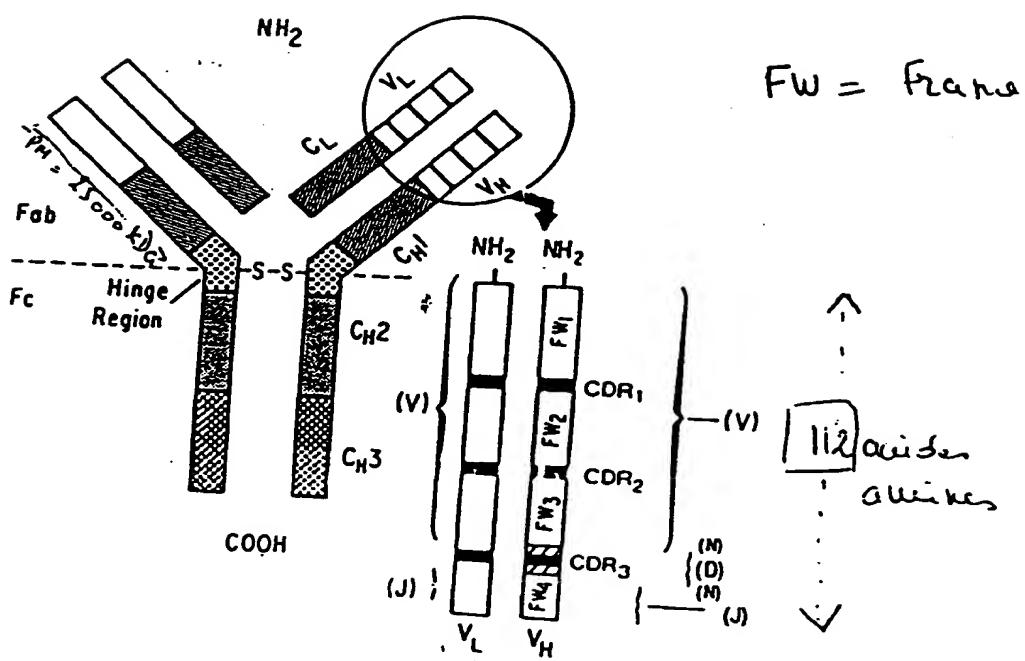


FIGURE 1

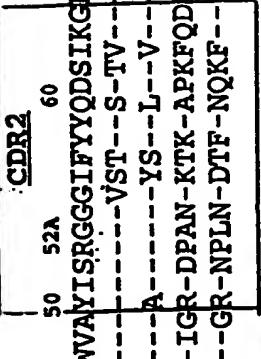
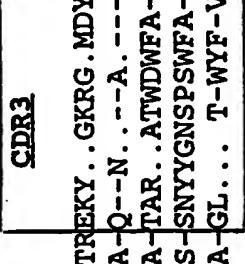
<p>J20. 8 F4. 1 F14. 6 H9. 3 A2. 1</p> <p>10            20            30            40            50            60</p> <p>GGSLKLSCAA SGFTSSYAMS WVRQTPAKRLEWVAY ISRGGGIIFYQDSIKGRFTI</p> <p>ET----- ALVKP----- ELVR--A-V-V-CTT---NIKODYIM----- GLVKP-A-V-V--NV--YS-TG-F-N-----</p>	<b>CDR1</b> 	<p>52A VST--S-TV-- A----- R-EQG----- SHG-S-----</p> <p>KA-L IGR-DPAN-KTK-APKFQDKA-- GR-NPLN-DTF-NQKF--KA-L</p>
<p>J20. 8 F4. 1 F14. 6 H9. 3 A2. 1</p> <p>70            80            ABC            90</p> <p>ARDNAKNTLYLQMSLRS ETDAMYCTREKY . GKRKG . MDYWGQGT SVTVSS</p> <p>S-----S-----A-----Q--N.. . . A.----- S-----R-----E-----A-TAR. . ATWDWFA-----L-----A TA-TSS--A--L---T-----V-----S-SNYYGNSPSWFA-----A TV-KSS--AHMELR--K--NS-V--CA-----GL... T-WIF-V-----A--T--L-A</p>	<b>CDR3</b> 	

FIGURE 2

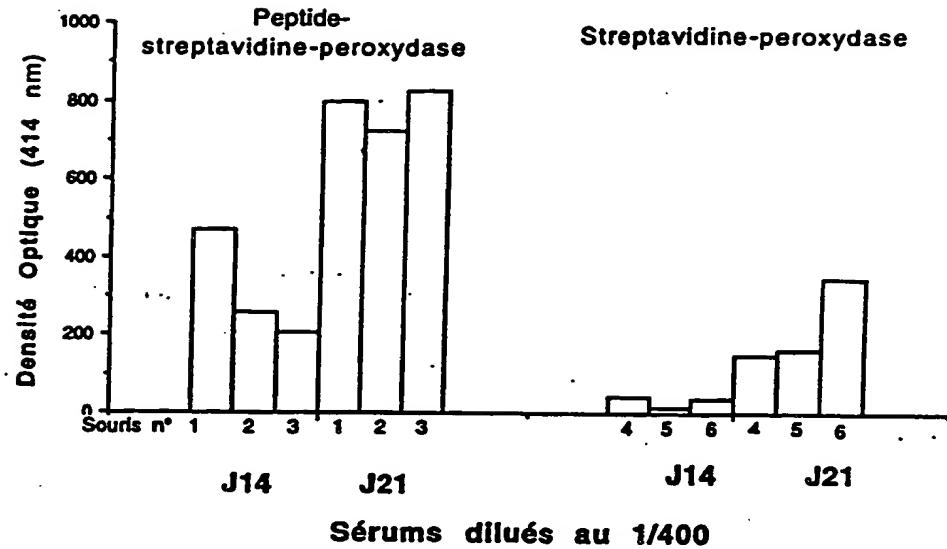
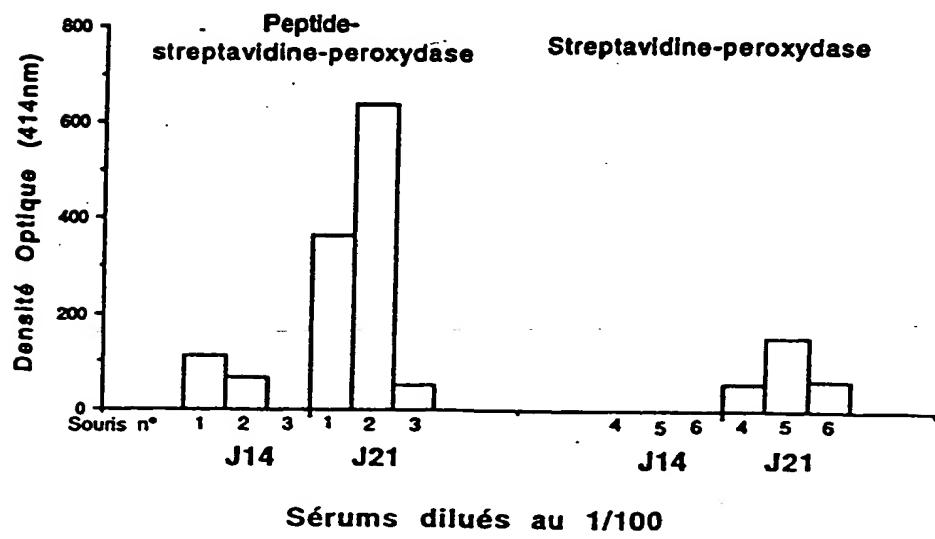
CDR2

YISRGGGIFYQDSIKG  
-----VST--S-TV--  
A-----YS--L--V--

CDR3

EKYGKRG MDY (J20.8)  
QKYNKRA MDY (F4.1)  
TARATWDW FAY (F14.6)

FIGURE 3

**Réponse anti-streptavidine****FIGURE 4A****Réponse anti-peroxydase****FIGURE 4B**

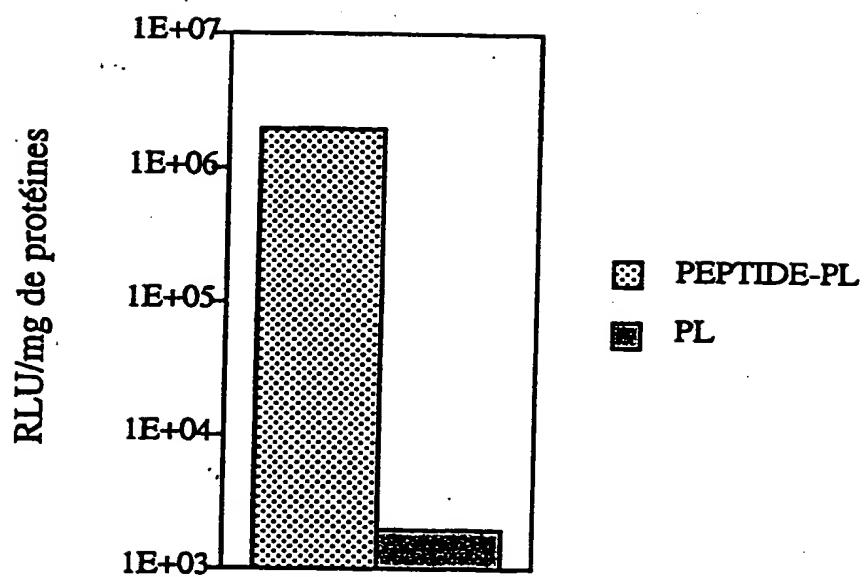


FIGURE 5